

## 両機能性を有する抗体としての SEA-scFv 融合蛋白 ， その大腸菌発現系の構築と機能解析

著者	櫻井 直樹
号	1566
発行年	1999
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/21797">http://hdl.handle.net/10097/21797</a>

氏 名（本籍）	さくら 櫻	い 井	なお 直	き 樹
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）			
学 位 記 番 号	医 博 第 1 5 6 6 号			
学位授与年月日	平 成 11 年 3 月 25 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）外科学系専攻			
学 位 論 文 題 目	SEA-scFv as a Bifunctional Antibody : Construction of a Bacterial Expression System and its Functional Analysis. （両機能性を有する抗体としての SEA-scFv 融合蛋白，その大腸菌発現系の構築と機能解析）			
	（主 査）			
論 文 審 査 委 員	教授 松 野 正 紀      教授 土 屋      滋			
	教授 菅 村 和 夫			

# 論文内容要旨

## 研究目的

外科的切除単独の治療が困難な肝外胆管癌に対して、我々は非特異的な抗腫瘍効果を有する T-LAK 細胞を用いた養子免疫療法に着目して、Bispecific 抗体の併用により T-LAK 細胞に targeting 性を与えて抗腫瘍効果を増強させることに成功した。さらに、腫瘍局所に存在する T 細胞の利用や T-LAK 細胞の生体内での活性化の持続性を考慮して、T-LAK 細胞に黄色ブドウ球菌産生毒素 SEA と抗体を化学的に融合した SEA 融合蛋白を併用して、同様な抗腫瘍効果の増強を得た。今回、我々は SEA 融合抗体を臨床応用する際の問題点である、操作・取り扱いの煩雑性、高費用、低腫瘍組織貫通性、高免疫原性を解決すべく、大腸菌を用いた SEA 融合蛋白の作製を試みた。抗体は、機能改変が容易な一本鎖抗体 (scFv) を用いた。作製した SEA 融合蛋白 SEA-scFv が化学的に融合した SEA 融合蛋白と同様、高い抗腫瘍活性を保持しているか否かについて検討した。尚、胆管癌に対する標的分子としては、腺癌関連抗原と呼ばれ胆管癌に高頻度に発現するムチンコア蛋白 MUC1 を用いた。

## 研究方法・結果

### 1. SEA-scFv 融合蛋白の大腸菌発現ベクターの構築

まず、SEA および抗 MUC1 抗体 MUSE11 の一本鎖抗体 (scFv) を大腸菌で発現させ、その機能が保持されていることを確認した (Fig.4)。一本鎖抗体のリンカーは (Gly4Ser1)<sub>3</sub> を用いた。ついで、SEA と MUSE11 scFv を short linker (Gly4Ser1) にて連結した SEA-scFv の遺伝子を pET-20b ベクターに組み込み、SEA-scFv 大腸菌発現ベクター pET SEA-scFv を作製した (Fig.1)。

### 2. 大腸菌を用いた SEA-scFv の発現、精製

上記発現ベクターを用いて大腸菌 BL21 (DE3) pLysS を形質転換し、IPTG にて発現を誘導した。融合蛋白 SEA-scFv は、大腸菌の全画分 (培養上清、ペリプラズム、細胞内可溶性画分、細胞内不溶性画分) で発現していることが Western blotting による解析にて確認できたが (Fig.3)、量的な問題から細胞内不溶性画分のみ精製が可能であった。細胞内不溶性画分の融合蛋白はまず強力な変性剤である塩酸グアニジンを用いて可溶化して、変性状態で融合蛋白の C 末端に付けた (His)<sub>6</sub> に特異的に結合する metal affinity resin を用いて精製した (Fig.2)。affinity chromatography により、ほぼ単一に精製が可能であった。精製した変性状態の融合蛋白は、段階透析にて塩酸グアニジンを除去することによる巻き戻し反応を行い、回収した。

### 3. 作製した SEA-scFv の Flowcytometry による機能解析

巻き戻し反応にて回収した SEA-scFv 融合蛋白について、Flowcytometry による機能解析を行った。その結果、その SEA によると思われる MHC class II を持つ T-LAK 細胞に結合する能力を持ち、また scFv によると思われる MUC1 陽性胆管癌細胞株 TFK-1 に結合する bifunctional な機能を有していることが確認された (Fig.5)。

### 4. MTS assay を用いた SEA-scFv の胆管癌細胞株 TFK-1, 肝細胞癌細胞株 HT-17 に対する細胞障害性試験

SEA-scFv は分子量から計算した同じモル濃度の化学的に融合した SEA-IgG と同様に、有意に濃度依存性の細胞傷害性の増加を示した (Fig.6)。一方、標的細胞を TFK-1 と HT-17 で比較すると、TFK-1 に比較して明らかに HT-17 では細胞傷害性が上昇しなかった (Fig.7)。これにより、SEA-scFv 融合蛋白の特異性が証明された。また T-LAK 細胞を使用しない細胞傷害性試験では、細胞傷害性が全く上昇せず (Fig.8)、SEA-scFv 融合蛋白の TFK-1 に対する毒性は低いものと考えられた。

### 5. 抗 MUC1 抗体, 抗 SEA 抗体を用いた SEA-scFv の細胞傷害性試験における阻害効果

SEA-scFv を用いて得られた細胞傷害性の増加は、阻害抗体としての抗 MUC1 抗体 MUSE11 および抗 SEA 抗体の投与により有意に阻害された (Fig.9, 10)。その阻害効果は、抗 SEA 抗体に比べて、抗 MUC1 抗体では、やや低い結果であった。この結果より、SEA-scFv の抗腫瘍活性はその scFv により TFK-1 に架橋化 (targeting) され、その SEA にて活性が増加した T-LAK 細胞によるものであることが考えられた。

## 結 語

遺伝子工学的に作製した SEA-scFv 融合蛋白は、MUC1 陽性癌細胞に対する T-LAK 細胞の抗腫瘍効果の特異的に増強させ、今後さらなる機能改変や臨床応用に期待ができる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

外科的治療が困難な高度進行胆管癌症例に対する治療成績の向上を目指して、lymphokine activated killer（以下 LAK）細胞を用いた養子免疫療法の基礎的研究を行っている。腺癌関連抗原である MUC1 を認識するマウス抗体 MUSE11 IgG とスーパー抗原 Staphylococcal enterotoxin A（SEA）とを化学的に合成した SEA-IgG を LAK 細胞に併用して、MUC1 陽性胆管癌細胞株 TFK-1 に対する抗腫瘍効果を *in vitro* および SCID 胆管癌マウスを用いた *in vivo* 治療モデルにて著明な抗腫瘍効果が得られている。

この SEA-IgG を臨床応用するためには、作製の煩雑性、低収量、ヒトに対する高免疫性、を解決しなければならず、このためより低分子の機能性抗体断片である一本鎖抗体（以下 scFv）に着目して、SEA と MUSE11 scFv を融合した SEA-scFv の大腸菌での作製を検討している。大腸菌にて作製した MUSE11 scFv および SEA の結合能を FACS にて確認した後、SEA の遺伝子と scFv の遺伝子を連結して大腸菌にて発現させている。まず SEA-scFv の発現を確認した後、ほぼ単一に精製を行っている。精製した SEA-scFv は TFK-1 および LAK 細胞の両者に結合活性を有している。

SEA-scFv の機能解析として、SEA-IgG との細胞傷害性試験の比較検討を行い、LAK 細胞単独では約 20% の細胞傷害活性であったものが、濃度依存性に細胞傷害性が上昇して、 $0.5 \mu\text{g/ml}$  では両融合蛋白とも約 80% の細胞傷害活性を示している。さらに標的細胞を MUC1 陰性株 HT-17 へ変更してその特異性を証明している。SEA-scFv 単独投与にて細胞への毒性は否定されている。さらに、抗 SEA 抗体および MUSE11 による抑制試験では、scFv の IgG に比べた結合活性の低さから MUSE11 での抑制効果が低くなっているようである。

結果として、大腸菌を用いた SEA-scFv の作製に成功し、SEA-IgG と同様十分に抗腫瘍効果を示し、またその特異性も証明された。特徴として、SEA-IgG に比べて作製が比較的容易であり、低分子量で免疫原性に加えて組織移行性や血中からの除去に優れていると考えられる。また標的分子の変更や、scFv の結合活性・免疫原性をより改善させるなど遺伝子工学的に容易に行える。今まで SEA を用いた融合蛋白は化学的に合成したものから遺伝子工学的に作製したものまで様々に報告されているが、より小さな機能分子である SEA-scFv の形での融合蛋白の遺伝子工学的な作製は世界に類を見ず、本研究は胆管癌だけでなく MUC1 陽性の様々な腺癌に対する特異的な免疫療法としてより臨床応用に近づいたものといえる。その意味でも学位論文に値する重要な研究と考えられる。